ловины сосуда Дьюара не более 5 минут. После этого помещаются в жидкий азот для длительного хранения. Процесс оттаивания заключается в выдержке эмбрионов в течение 8-12 секунд при комнатной температуре (порядка 20° С), затем в водяной бане при 30° С в течение 10-12 секунд. В настоящее время проводится работа по оценке эффективности данного способа. Однако предварительные данные на небольшом количестве эмбрионов показывают более 20% развитие до стадии реэкспандированной бластоцисты после кратковременного культивирования.

SUMMARY

Although frozen-thawed in vitro embryos have resulted in the birth of many thousand of normal healthy calves, it is established that such embryos are much more sensitive to freezing than in vivo-derived embryos. Pregnancy rates such embryos are generally lower than those reported for in vivo-derived. There are many well-documented differences at the morphological, ultrastructural, metabolic, biochemical level between the two categories of embryos. Chilling of in vitro derived bovine embryos depends on their developmental stage, culture conditions and on presence of numerous lipid droplets in their cytoplasm.

Литература

1. Holm P., Callesen H.In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practication application.Reprod. Nutr. Dev. 1998, v. 38. 579-594.
2. Fair T. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. Mol Reprod.Dev. 2001. v. 58. 186-195.
3. Pollard, J.W.; Leibo, S.P. Chiling sensitivity of mammalian embryos.Theriogenology. 1994. v. 41. 101-106.
4. Massip, A et.al. A. Morphology and biochemistry of in vitro-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Hum. Reprod., v. 10. 3004.
5. Rieger D, Pollard JW, Leibo SP. The effect of cryopreservation on the metabolic activity of in vitro produced cattle blastocyst.Cryobiology. 1993. 30. 631.
6. Partridge RJ.et.al. Glucose uptake and lactate production by single frozen-thawed bovine embryos produced in vivo or by in vitro fertilisation. J Reprod. Fert. 1995. 13. 41.
7. Khurana NK, Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. Theriogenology. 2000. 54. 313-326.
8. Rizos D. et.al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol. Reprod. Dev. 2002. 61. 234-248.
9. Rizos D. et. al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. Biol Reprod 2002. 66. 589–95.
10. Gordon. I. Laboratory production of cattle embryos. 2003.
11. Imai K. et. al. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryos. 2002. 64 (10). 887-891.
12. Sang-Rae Cho. Enhanced Cryosurvival of Bovine Blastocysts Produced in Vitro in Serum-Free Medium Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2002 V. 19 (10). 487-492.
13. Pereira R.M. et.al. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). 15th Inter.Congress on animal Reprod. 8-12 Aug. 2004. v. 2. 538.

В.В. Тимон, Т.Ф. Петренко, Е.И. Гончарук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В СРЕДЕ, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ

В деле сохранения генетических ресурсов млекопитающих и, в частности, человека, ключевую позицию занимает вопрос создания низкотемпературных банков хранения биологических объектов. Одной из базовых задач существования банков является разработка оптимальных способов низкотемпературного хранения клеток и тканей, что включает в себя, как раздел, отработку максимально щадящих сред криоконсервирования и сокращение манипуляций с материалом на этапе деконсервации [3].

В медицинской практике широкое применение в последние десятилетия приобрели биотехнологические методы, и особенно клеточная терапия [5]. Создаются хранилища аутологичных крови, стволовых клеток, специализированных клеток, в частности, фибробластов и т.д.[3, 6] Стратегия лечения может требовать неоднократного введения клеточного материала, поэтому возникает необходимость в криоконсервировании. Для внутривенного введения не разрешены протекторы, стандартно используемые в криобиологической практике, что предполагает обязательное их удаление перед применени-

ем для пациента [2]. Известно, что некоторые вещества способствуют реабилитации клеток после действия повреждающих факторов. Среди них ведущую роль играет эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота [1, 7]. По своему составу она содержит ряд белковых фракций различной молекулярной массы, гормоны, факторы роста, ферменты и т.д. [7, 8], что делает её незаменимым источником биологически активных веществ для клеток. Перспективной средой криохранения аутологичных клеток могла бы быть среда с использованием собственной сыворотки крови пациента, что позволило бы решить целый ряд проблем.

В данном исследовании мы рассматривали перспективу использования сыворотки крови как вещества с вероятными криопротективными свойствами для замораживания культуры фибробластов человека. Целью работы являлось изучить возможность криоконсервирования клеток культуры эмбриональных фибробластов человека в среде, содержащей эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (ЭС) без добавления криопротекторов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки культуры эмбриональных фибробластов человека (ФЭЧ) 3-5 пассажей. Эмбрионы 7-9 недель гестации получали в результате легальных абортов от здоровых женщин по их добровольному согласию после решения консилиума врачей. Материал проверяли на отсутствие инфицирования методом ПЦР, бактериальную обсеменённость рутинными методами.

В качестве компонентов сред криоконсервирования использовали ростовую среду 199 и ЭС в следующих соотношениях: ростовая среда 199, ростовая среда 199+20% ЭС, ростовая среда 199+50% ЭС, 100% ЭС. Суспензию клеток, приготовленную на ростовой среде, разливали в пластиковые криопробирки фирмы «Nunc» в конечном объёме 1 мл с добавлением необходимого количества ЭС. В случае криоконсервирования в ЭС клетки предварительно осаждали центрифугированием.

Криоконсервирование производили по двум программам [9]: 1) 30-40є/мин до -28° С, 15-минутная остановка и погружение в жидкий азот и 2) 1-2є/мин до -40єС с последующим погружением в жидкий азот.

Отогрев образцов производили по истечении 7 дней на водяной бане. После этого клетки высевали в культуральные флаконы и культивировали в среде 199, содержащей 10% ЭС в CO_2 –инкубаторе при 37°С и 5% CO_2. Контролем служили клетки культуры ФЭЧ, замороженные под защитой 10% ДМСО.

Оценку жизнеспособности проводили по исключению клетками суправитального красителя трипанового синего, количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Пролиферативные свойства клеток оценивали методом культивирования in vitro [1, 4].

Результаты и обсуждение

При замораживании клеток культуры ФЭЧ по разным программам в среде с различным содержанием ЭС наблюдается разница в их жизнеспособности (таб.).

Как видно из таблицы, при замораживании клеток в ростовой среде по программе № 1 сохраняется в 4 раза меньше жизнеспособных клеток, чем в контроле. Добавление в среду консервирования 20 и 50% сыворотки позволило повысить процент жизнеспособных клеток. При полной замене ростовой среды на ЭС (100%) количество жизнеспособных клеток достоверно не отличается от контрольного показателя.

При использовании программы № 2 для криоконсервирования ФЭЧ в ростовой среде количество жизнеспособных клеток было в 6 раз меньше, чем в контрольном образце. В случае присутствия в среде замораживания ЭС в концентрации 20% количество жизнеспособных клеток

Сохранность клеток культуры ФЭЧ после криоконсервирования в среде, не содержащей криопротекторы (n=5, M±m).

Условие эксперимента	Жизнеспособность клеток, %	
	Программа № 1	Программа № 2
10% ДМСО	88±2*	84±1
Ростовая среда	21±3	14±3
Ростовая среда+20% ЭС	40±3*	35±3*
Ростовая среда +50% ЭС	63±2	53±3
100% ЭС	90±1*	76±1

* - Различия достоверны P<0,05, за исключением отмеченных * данных - недостоверная разница

повысилось, но было в 2,4 раза меньше, чем в контроле. При повышении процентного содержания ЭС до 50% количество жизнеспособных клеток увеличилось в 1,5 раза по сравнению с предыдущим показателем. Замораживание клеток культуры в ЭС позволило сохранить 76±1% жизнеспособных клеток, что достоверно меньше контрольного показателя и показателя, полученного при замораживании по программе № 1.

Как видно из приведенных данных, использование программы №1 более эффективно по сравнению с программой № 2.

При культивировании клеток ФЭЧ после криоконсервирования было установлено, что клетки после замораживания в ростовой среде и с 20% содержанием сыворотки адгезировали и распластывались единично и не обладали способностью к дальнейшей пролиферации. В пробах, где процент ЭС составлял 50% и 100%, наблюдали пролиферация клеток с образованием монослоя, но на 3-4 дня позже, чем в контроле, т.е. на 7-8 сутки.

Можно сделать следующие выводы:

• клетки не теряют способность к адгезии и пролиферации после криоконсервирования в среде, содержащей ЭС без добавления криопротекторов;

• количество жизнеспособных клеток увеличивается с повышением процентного содержания ЭС в среде замораживания;

• программа № 1 оптимальна для замораживания клеток культуры ЭФЧ в среде, не содержащей криопротекторы.

Таким образом, возможно использовать сыворотку крови в качестве среды для криоконсервирования культуры клеток человека. Использование бескриопротекторной среды, не требующей отмывания перед использованием клеток, снижает количество манипуляций с материалом и риск контаминации. Мы предполагаем возможность использования сыворотки аутологичной крови пациента в качестве среды криохранения запаса собственных клеток человека.

SUMMARY

We have cryopreserved the human fibroblast culture in medium containing fetal bovine serum with no cryoprotectants. There were 63±2% viable cells in the medium with 50% FBS and 90±1% viable cells in 100% FBS after cryopreservation. The two cryopreservation programs were used and it was determined that the first one with 30-40° per minute down to -28°C with stopping for 15 min and subsequent immersion into liquid nitrogen is optimal. It is possible to cryopreserve the human diploid cells with high survival in medium with no cryoprotectants.

Литература

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир 1983. 264 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. Киев.: Наукова думка. 1979. 100 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев.: Наукова думка. 1994. С. 32–200.
4. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н.. Руководство по применению клетокчных культур в вирусологии. Л.: Медицина. 1976. 224 с
5. Грищенко В.И., Юрченко Г.Г. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные, эмбриональные и фетальные клетки // Проблемы криобиологии. 1998. № 4. С. 7-13.
6. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии // Международный мед. журнал. 1999. № 4. С. 6-10.
7. Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р.Фрешни. М.: Мир. 1989. 333 с., ил.
8. Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. Отв. ред. Г.П. Пинаев. Л.: Наука. 1988. 287 с.
9. Петренко Т.Ф. Влияние криоконсервирования на морфо-функциональные свойства клеток перевиваемых культур. Автореферат диссертации на соискание научной степени кандидата биологических наук. Харьков 1986.

И.Ш. Шапиев, Е.В. Никиткина

ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ И ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Одной из задач в реализации программы сохранения генетических ресурсов является разработка методов криоконсервации и оценки функционального состояния сперматозоидов животных до и после криоконсервации.

Одним из наиболее чувствительных к повреждающему действию низких темпе-